

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СПОСОБНОСТИ ПОДАВЛЕНИЯ РОСТА РОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ У РИЗОБИЙ

© 2023 г. Ал. Х. Баймиев^a *, А. А. Владимирова^a, Р. Т. Матниязов^a, А. М. Лавина^a,
К. Ю. Филяева^a, Е. С. Акимова^a, Ан. Х. Баймиев^a

^a Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: baymiev@mail.ru

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 07.07.2023 г.

Проведен скрининг 1019 штаммов ризобий *Rhizobium leguminosarum* и *Neorhizobium galegae* из коллекции симбиотических ризосферных микроорганизмов “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН, изолированных из клубеньков 20 видов бобовых растений, на способность подавлять рост родственных штаммов ризобий. Исследования показали, что подавление роста конкурирующих бактерий ризобиями довольно распространенное явление. В среднем, при выращивании на богатых средах около 10% штаммов ризобий выделяли в среду антибактериальные вещества. Отмечено, что когда на газон бактерий наносилась живая культура ризобий, процент подавления был выше. Также процент штаммов, синтезирующих антибактериальные вещества, в некоторой степени соотносится с уровнем генетического разнообразия популяции микросимбионтов бобового растения. Слабый сигнал нарушения синтеза белка обнаружен при исследовании механизма действия метаболитов 20 штаммов ризобий *R. leguminosarum* bv. *viciae* из клубеньков чины болотной и чины весенней. В остальных случаях характер антибактериального действия метаболитов бактерий с применением системы DualRep2 определить не удалось.

Ключевые слова: ризобии, подавление роста бактерий, антибактериальный механизм

DOI: 10.31857/S0026365623600311, **EDN:** BSITVE

Ризобии или клубеньковые бактерии, вступающие в азотфиксирующий симбиоз с бобовыми растениями, довольно хорошо изучены. Это связано как с фундаментальным интересом к проблеме взаимодействия растения и бактерий, находящихся в эволюционном процессе образования новой органеллы клеток — симбиосомы, так и с практическим. Поскольку фиксация атмосферного азота в соединения, способные усваиваться растением, в клубеньках происходит за счет “экологически чистой” энергии Солнца. Тем не менее, с точки зрения экологии симбиотических микроорганизмов, вопросы регуляции их численности, взаимодействия с микрофлорой ризосферы в процессах инициации формирования клубенька, происходящих в ризосфере и ризоплане растения-хозяина, остаются не до конца решенными.

Одни из таких вопросов — как происходит регуляция численности и состава ризосферных микроорганизмов на месте формирования инфекционной нити? Почему именно этот штамм в конечном итоге сформировал клубенек?

Некоторые ответы на эти вопросы были получены еще в 60-х гг. прошлого века с обнаружением у некоторых ризобий бактериоцинов — соедине-

ний различной природы, специфично подавляющих рост гомологичных бактерий. Способность синтезировать и выделять в окружающую среду бактериоцины позволяет штамму ризобий контролировать численность других бактерий и дает неоспоримые преимущества в конкурентной борьбе за возможность формировать клубенек. Эти соединения были условно разделены на малые, средние и большие бактериоцины на основе их предполагаемых размеров и характеристик диффузии (Schwinghamer, Brockwell, 1978; Hirsch, 1979). Впоследствии оказалось, что малые бактериоцины представляют собой N-ацил-гомосеринлактоны (AHL) и относятся к сигналам чувства кворума ризобий (Fuqua et al., 1994). Крупные бактериоцины были идентифицированы как дефектные бактериофаги (Schwinghamer et al., 1973). Наибольший интерес с практической точки зрения представляют средние, имеющие пептидную природу антибактериальные соединения, которые и называют сейчас бактериоцинами. К настоящему времени хорошо описаны два рибосомно синтезированных и посттрансляционно модифицированных пептида (RiPP) — трифолитоксин (Triplett et al., 1987; Lethbridge et al., 2022) и фазолицин (Travin et al., 2019),

которые работают как узкоспецифичные антибиотики. Фазолизин — очень узкоспециализированный ингибитор трансляции, который блокирует работу рибосом лишь некоторых бактерий порядка *Rhizobiales* и представляет интерес не только как регулятор численности ризобий, но и как перспективная антибактериальная молекула.

До сих пор исследования синтеза ризобиями соединений, подавляющих или регулирующих численность посторонней микрофлоры (по большей части родственной, вследствие конкуренции за формирование клубенька), имели частный характер и проводились на единичных штаммах. Практически нет данных о характере распространения явления и параметров синтеза антибактериальных соединений в природных популяциях ризобий, что крайне важно для исследования экологии сообществ симбиотических бактерий.

Целью данной работы являлось исследование распространенности и молекулярных механизмов способности к подавлению роста родственных бактерий у штаммов ризобий, вступающих в симбиоз с дикорастущими бобовыми растениями Южного Урала.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 1019 штаммов ризобий из коллекции “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН. Из них 769 штаммов относились к *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, 147 — к *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, 10 — к *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* и 93 — к *Neorhizobium galegae*. Штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* включали 31 штамм ризобий горошка лесного (*Vicia sylvatica* L.), 15 штаммов ризобий горошка гороховидного (*V. pisiformis* L.), 78 штаммов ризобий горошка заборного (*V. sepium* L.), 33 штамма ризобий горошка мышиного (*V. cracca* L.), 168 штаммов ризобий чины весенней (*Lathyrus vernus* L. Bernh.), 77 штаммов ризобий чины бледноватой (*L. pallescens* (Bieb.) C. Koch), 48 штаммов ризобий чины болотной (*L. palustris* L.), 87 штаммов ризобий чины лесной (*L. sylvestris* L.), 64 штамма ризобий чины Литвинова (*L. litvinovii* Iljin), 49 штаммов ризобий чины клубненосной (*L. tuberosus* L.), 51 штамм ризобий чины гороховидной (*L. pisiformis* L.), 41 штамм ризобий чины луговой (*L. pratensis* L.), 27 штаммов ризобий чины Гмелина (*L. gmelinii* Fritsch). Штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii* включали 52 штамма ризобий клевера лугового, 13 штаммов ризобий клевера люпиновидного, 15 штаммов ризобий клевера белого, 10 штаммов ризобий клевера среднего, 57 штаммов ризобий клевера розового. Штаммы *N. galegae* включали 93 штамма ризобий козлятника восточного (*Galega orientalis*). Штаммы *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* включали 10 штаммов ризобий фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*).

Культивирование. Для получения бактериального газона использовали штаммы клубеньковых бактерий из коллекции “Симбионт” ИБГ УФИЦ РАН: *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9, изолированный из клубеньков горошка лесного, и *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2 из клубеньков фасоли обыкновенной. На чашку Петри с агаризованной питательной средой ТУ (1% триптон, 0.1% дрожжевой экстракт, 0.1% CaCl₂) наносили 3 мл двухсуточной культуры бактерий, инкубированной в термостатируемом шейкере ES-20 (“BioSan”, Латвия) при 28°C. Чашку Петри покачивали до равномерного распределения жидкости, оставшуюся часть которой удаляли, используя дозатор со сменными стерильными наконечниками. После этого чашки Петри оставляли приоткрытыми для подсушивания посева в боксе микробиологической безопасности БМБ-II “Ламинар-С”-1,2. Далее бактерии инкубировали в термостате при 28°C в течение суток.

Для получения газона *E. coli* JW5503(ΔtolC) использовали ночную культуру рекомбинантного штамма, выращенную в питательной среде LB (Лурия-Бертани) с добавлением ампициллина (50 мкг/мл).

Анализ на продукцию антимикробных веществ. Штаммы ризобий из коллекции после криохранения высаживали на твердую питательную среду УМ. Далее наращивали бактериальную суспензию исследуемых штаммов в 4 мл питательной среды RM в 15 мл пробирках типа Falcon. Пробирки инкубировали в термостатируемом шейкере ES-20 (“BioSan”, Латвия) при 28°C в течение 2 сут. При необходимости получения большего объема бактериальной суспензии штаммы для подложки выращивали в стеклянных колбах объемом 100 мл. Для анализа продукции бактериями антимикробных соединений отбирали по 500 мкл суспензии и переносили в стерильные пробирки эппендорф. Затем осаждали бактерии при 3000 g в течение 5 мин в центрифуге MiniSpinPlus (“Eppendorf”, Германия). Далее на бактериальный газон наносили по 0.5 мкл непосредственно суспензии клеток и по 5 мкл надосадочной жидкости. Чашки помещали на сутки в термостат: 28°C для ризобияльного газона и 37°C для *E. coli*. По окончании инкубации проводили визуальную оценку зон подавления роста газона бактерий с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP (“Bio-Rad”, США).

Определение механизма действия антибактериальной активности образцов проводили с использованием газона клеток *E. coli* JW5503(ΔtolC) с плазмидой pDualRep2 (рис. 1д, 1е). Вектор pDualRep2 содержит гены двух флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм). В случае если антибиотик действует на процесс синтеза белка — задержка работы рибосомы (например, RiPP пеп-

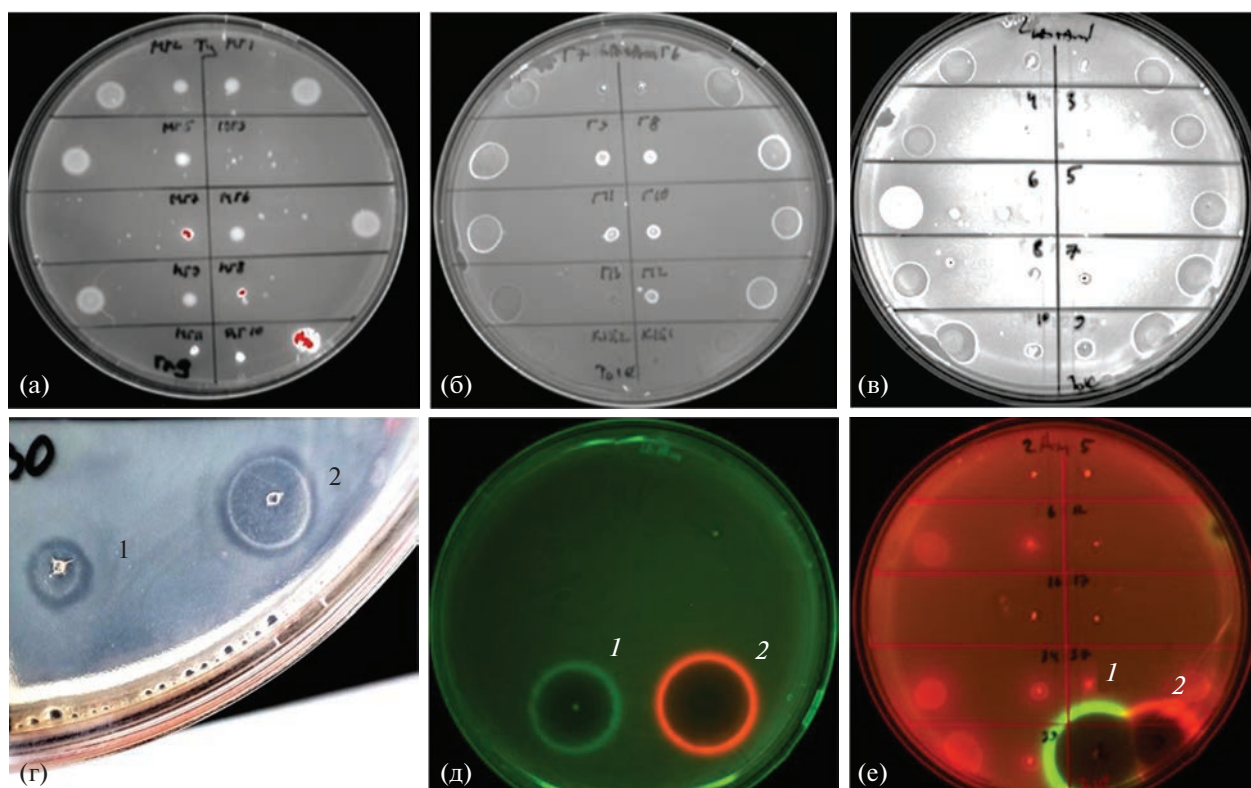


Рис. 1. Примеры подавления роста бактерий штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, изолированными из клубеньков чины болотной: а — на газоне клеток *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9; б — на газоне клеток *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2; в — на газоне клеток *E. coli* JW5503(ΔtolC) (обычный свет); г — ореол подавления роста вокруг нанесенных живых бактерий (1) и культуральной жидкости (2); д, е — на газоне клеток *E. coli* JW5503(ΔtolC) с плазмидой pDualRep2 в геле-документирующей системе ChemiDoc MP. Контрольные антибиотики: левофлоксацин (1), эритромицин (2).

тиды, эритромицин), экспрессия дальне-красного белка Katushka2S возрастает. Экспрессия красного флуоресцентного белка RFP увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа на массовое повреждение ДНК (например, левофлоксацин) (Osterman et al., 2016). Антибактериальную активность веществ оценивали по размеру пятна подавления роста и, при наличии, по цвету ореола вокруг него на газоне клеток *E. coli* с помощью геле-документирующей системы ChemiDoc MP (“Bio-Rad”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале работы проводили подбор питательных сред и отработку методики культивирования ризобий с наибольшим выходом антибактериальных метаболитов, поскольку клубеньковые бактерии из коллекции “Симбионт” относятся к разным родам и различаются как скоростью деления клеток, так и прочими физиологическими параметрами. В качестве контроля использовали синтезирующий фазолицин штамм *Rhizobium* sp. Por5, любезно предоставленный для исследований профессором Martinez Romero (Travin et al., 2019).

Исследования показывают, что продукция бактериоцина у ризобий происходит спонтанно во время ранней и средней экспоненциальной фазы роста бактерий в жидкой культуре (Schwinghammer, 1975). Выработка фазолицина у штамма *Rhizobium* sp. Por5 наблюдалась нами при выращивании на следующих питательных средах: YM (1% маннитол, 0.01% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄, 0.04% дрожжевой экстракт); RM (1% маннитол, 0.01% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄, 0.1% дрожжевой экстракт; pH 6.8); C40 (2% сахара, 0.02% KH₂PO₄, 0.08% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, FeCl₃ (следы), Na₂MoO₄ (следы), 0.04% дрожжевой экстракт); TY (1% триптон, 0.1% дрожжевой экстракт, 0.1% CaCl₂). Лучшие результаты (по величине пятна подавления) наблюдали при использовании среды RM.

При подборе бактерий для получения газона выяснилось, что не все штаммы ризобий из коллекции дают стабильно ровный слой клеток. На средах, дающих стабильную наработку фазолицина у *Rhizobium* sp. Por5, штаммы рода *Sinorhizobium* (*Ensifer*) формировали неравномерный слой клеток вследствие чрезмерной наработки полисахаридов, что сильно затрудняло анализ результа-

тов. Штаммы *Mezorhizobium*, характеризующиеся более медленным ростом на питательных средах и образующие колонии на чашках Петри на 5–6 сут культивирования, также не формировали равномерного газона. Таким образом, для получения бактериального газона были отобраны штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9 и *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2, которые не подавляли рост других бактерий и стабильно наращивались в жидкой питательной среде YM в течение 2 сут (рис. 1а, 1б). В дальнейшую работу брали только штаммы ризобий из рода *Rhizobium*, собранные из клубеньков различных дикорастущих растений Южного Урала.

Так как на питательных средах YM, RM и C40 колонии ризобий ослизнялись, для получения газона бактерий использовалась неуглеводная питательная среда TY. Бактерии *E. coli* для газона выращивали на богатой белковой среде LB.

Наиболее адекватные результаты ингибирования роста получались при нанесении на газон клеток 5 мкл супернатанта свежей ночной культуры ризобий. Изначально планировалось на газон бактерий наносить каплю культуральной среды и экстракта цитоплазмы разрушенных клеток каждого штамма ризобий. Однако последний вариант давал неоднозначные результаты при всех вариантах способов разрушения клеток (механические, ферментативные, криогенные) и способов фракционирования их содержимого (центрифугирование, высаливание, разделение спиртом и ацетоном и др.). Поэтому от него отказались в пользу точечного нанесения на газон 0.5 мкл культуры испытуемого штамма (рис. 1г).

В общей сложности было проанализировано 1019 штаммов ризобий из коллекции “Симбионт”. На газоне *R. leguminosarum* bv. *viciae* VSyl9 из 1019 исследованных штаммов 113 (11.1%) показали подавление роста при воздействии среды, где они культивировались, и 142 (13.9%) — непосредственно живых ризобий; на газоне *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* PVu2 из 1019 штаммов 126 (12.4%) при воздействии среды и 252 (24.7%) — культуры ризобий; на газоне *E. coli* JW5503(ΔtolC) из 1019 штаммов 582 (57.1%) при воздействии среды и 249 (24.4%) — культуры ризобий (табл. 1).

Результаты исследования показывают, что подавление роста конкурирующих бактерий штаммами ризобий довольно распространенное явление. В среднем, при выращивании на богатых средах, более 10% штаммов ризобий нарабатывали и секретируют в среду вещества, подавляющие рост бактерий. Отмечено, что когда на газон наносилась живая культура ризобий, процент подавления в среднем был выше. Особенно это заметно у ризобий чины весенней, чины клубне-носной и козлятника восточного. Однако в то же время у бактерий чины гороховидной наблюдается обратная картина. Это можно объяснить тем, что в некоторых случаях синтез антибактериальных со-

единений активируется в присутствии бактерий газона, хотя предварительные опыты на нескольких штаммах ризобий, в том числе на *Rhizobium* sp. Por5, показали отсутствие усиления синтеза антибактериальных веществ при добавлении в культуру живых и мертвых бактерий *Rhizobium* и *E. coli*.

Процент штаммов, синтезирующих антибактериальные вещества, в некоторой степени коррелирует с их уровнем панмиктичности, выраженной в генетическом разнообразии бактерий в популяции (Баймиев и соавт., 2012). То есть, чем большее генетическое разнообразие показывают RAPD- и ПДРФ-профили изолятов из клубеньков растения, тем больше среди них штаммов, продуцирующих антибактериальные вещества. Вероятно, феномен связан с отбором “агрессивных” штаммов в условиях жесткой конкуренции между бактериями за формирование клубенька. В целом, штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* проявляют большую антибактериальную активность, чем *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. У штаммов *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* подавление роста газона ризобий не наблюдали, хотя штамм *Rhizobium* sp. Por5, продуцирующий фазолицин, был выделен из клубеньков дикой фасоли, произрастающей в лесах Лос-Тукстлас (Мексика).

Механизм действия антибактериальной активности штаммов исследовали на газоне клеток *E. coli* JW5503(ΔtolC) с плазмидой pDualRep2. Штамм *E. coli* JW5503(ΔtolC) сверхчувствителен к антибиотикам, поскольку состоит из бактерий с удаленным геном *tolC* (Baba, Mori, 2008). TolC является основным порином системы эффлюкса, выводящим различные соединения из клетки через внешнюю мембрану. Поэтому на нем хорошо проявляется действие антибактериальных соединений в виде подавления роста газона. Метод добавления живых ризобий на газон *E. coli* оказался не очень эффективным вследствие более быстрого роста последних. Так как антибактериальные метаболиты ризобий не убивали, а только подавляли рост бактерий газона, то вместо темного пятна и цветного ореола, наблюдаемых при действии контрольных антибиотиков, наблюдали темные и цветные пятна (рис. 1е). При этом сигнала SOS-ответа при воздействии супернатантов и культур ризобий обнаружено не было. Слабый сигнал нарушения синтеза белка выявлен при исследовании метаболитов 20 штаммов ризобий *R. leguminosarum* bv. *viciae* из клубеньков чины бо-лотной и чины весенней.

К сожалению, в остальных случаях характер антибактериального действия метаболитов бактерий с применением системы DualRep2 определить не удалось. Видимо, в большинстве случаев для подавления роста конкурирующих штаммов ризобий используют иные механизмы, нежели синтез бактериоцинов, подавляющих синтез белка или вызывающих нарушение метаболизма нуклеиновых

Таблица 1. Подавление роста клеток газона бактерий метаболитами и живыми культурами ризобий

Вид бактерий	Растение-хозяин (количество штаммов ризобий, взятых в анализ)	Штамм бактерий газона					
		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> VSyl9		<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> PVu2		<i>E. coli</i> JW5503(Δ tolC)	
		°	●	°	●	°	●
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	bv. <i>viciae</i>	Горошек лесной (31)	1 (3.2%)	— (0%)	1 (3.2%)	— (0%)	21 (67.7%)
		Горошек гороховидный (15)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	9 (60%)
		Горошек заборный (78)	10 (12.8%)	2 (2.6%)	10 (12.8%)	2 (2.6%)	16 (20.5%)
		Мышиный горошек (33)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	8 (24.2%)
		Чина бледноватая (77)	11 (14.3%)	16 (20.8%)	18 (23.4%)	22 (28.6%)	5 (6.5%)
		Чина болотная (48)	3 (6.2%)	3 (6.2%)	3 (6.2%)	2 (4.2%)	17 (35.4%)
		Чина лесная (87)	9 (10.3%)	2 (2.3%)	22 (25.3%)	18 (20.7%)	15 (17.2%)
		Чина Литвинова (64)	1 (1.6%)	16 (25%)	28 (43.7%)	20 (31.2%)	35 (54.7%)
		Чина клубненосная (49)	17 (34.7%)	2 (4.1%)	38 (77.5%)	6 (12.2%)	10 (20.4%)
		Чина гороховидная (51)	5 (9.8%)	34 (66.7%)	5 (9.8%)	18 (35.3%)	30 (58.8%)
		Чина луговая (41)	3 (7.3%)	5 (12.2%)	3 (7.3%)	4 (9.7%)	6 (14.6%)
		Чина весенняя (168)	52 (30.9%)	21 (12.5%)	92 (54.8%)	18 (10.7%)	52 (30.9%)
		Чина Гмелина (27)	5 (18.5%)	3 (11.1%)	4 (14.8%)	1 (3.7%)	— (0%)
	bv. <i>trifolii</i>	Клевер луговой (52)	1 (1.9%)	— (0%)	2 (3.8%)	3 (5.8%)	10 (19.2%)
		Клевер люпиновидный (13)	— (0%)	2 (15.4%)	— (0%)	— (0%)	3 (23.1%)
		Клевер белый (15)	2 (13.3%)	— (0%)	1 (6.7%)	— (0%)	12 (80%)
		Клевер средний (10)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	3 (30%)
		Клевер розовый (57)	5 (8.8%)	3 (5.3%)	3 (5.3%)	6 (10.5%)	12 (21.0%)
	bv. <i>phaseoli</i>	Фасоль обыкновенная (10)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	— (0%)	2 (20%)
<i>Neorhizobium galegae</i>		Козлятник восточный (93)	17 (18.3%)	4 (4.3%)	22 (23.6%)	6 (6.4%)	13 (14.0%)

Примечание. ° — укол бактериями; ● — культуральная жидкость.

кислот. Такие как, например, включение чувства кворума через синтез AHL (Fuqua et al., 1994).

Вполне возможно, что штаммов ризобий, синтезирующих антибактериальные пептиды гораздо больше, чем обнаруживается с помощью системы DualRep2. К сожалению, уверенную детекцию включения синтеза флуоресцентных белков можно гарантировать только при хроматографической концентрации антибактериальных метаболитов в образце, даже у контрольного штамма *Rhizobium* sp. Pop5 (Travin et al., 2019).

Показано, что RiPP-пептиды попадают в клетки ризобий сразу двумя путями — через переносчики пептидов VasA и YefABEF, необходимые для установления симбиоза с бобовыми, что делает

затруднительным приобретение устойчивости к таким антибиотикам (Travin et al., 2023). Поэтому ризобиальные бактериоцины представляют интерес с практической точки зрения как агенты биоконтроля численности ризобактерий в почве и являются перспективными молекулами для создания новых антибиотиков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с привлечением приборного парка ЦКП “Биомика” (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП “Агидель”) и УНУ “КОДИНК”.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00193, <https://rscf.ru/project/22-24-00193/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баймиев А.Х., Иванова Е.С., Птицын К.Г., Белимов А.А., Сафронова В.И., Баймиев Ал.Х. Генетическая характеристика клубеньковых бактерий дикорастущих бобовых Южного Урала // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2012. Т. 27. С. 29–34.
- Baimiev An.K., Ivanova E.S., Ptitsyn K.G., Belimov A.A., Safronova V.I., Baimiev Al.K. Genetic characterization of wild leguminous nodular bacteria living in the South Urals // Mol. Genet. Microbiol. Virol. 2012. V. 27. P. 33–39.
- Baba T., Mori H. The construction of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection in *Escherichia coli* K-12 // In Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics / Methods in Molecular Biology: Humana Press, 2008. P. 171–181.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 269–275.
- Hirsch P.R. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* // J. Gen. Microbiol. 1979. V. 113. P. 219–228.
- Lethbridge B.J., Asenstorfer R.E., Bailey L.S., Breil B.T., Johnson J.V., Jones G.P., Rumjanek V., Sims J.J., Tate M.E., Triplett E.W. Post translational modifications of Trifolitoxin: a blue fluorescent peptide antibiotic // J. Antibiotics. 2022. V. 75. P. 125–135.
- Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryayev D.I., Korniltsev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., Bogdanov A.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Sorting out antibiotics' mechanisms of action: a double fluorescent protein reporter for high-throughput screening of ribosome and DNA biosynthesis inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. 2016. V. 60. P. 7481–7489.
- Schwinghamer E.A. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii* // J. Gen. Microbiol. 1975. V. 91. P. 403–413.
- Schwinghamer E.A., Brockwell J. Competitive advantage of bacteriocin and phage-producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture // Soil Biol. Biochem. 1978. V. 10. P. 383–387.
- Schwinghamer E.A., Pankhurst C.E., Whitfeld P.R. A phage-like bacteriocin of *Rhizobium trifolii* // Can. J. Microbiol. 1973. V. 19. P. 359–368.
- Travin D.Y., Jouan R., Vigouroux A., Inaba-Inoue S., Lachat J., Haq F., Timchenko T., Sutormin D., Dubiley S., Beis K., Moréra S., Severinov K., Mergaert P. Dual-uptake mode of the antibiotic phazolicin prevents resistance acquisition by gram-negative bacteria // mBio. 2023. V. 14. P. e00217–23.
- Travin D.Y., Watson Z.L., Metelev M., Ward F.R., Osterman I.A., Khven I.M., Khabibullina N.F., Serebryakova M., Mergaert P., Polikanov Y.S., Cate J.H.D., Severinov K. Structure of ribosome-bound azole-modified peptide phazolicin rationalizes its species-specific mode of bacterial translation inhibition // Nat. Commun. 2019. V. 10. P. 4563.
- Triplett E.W., Barta T.M. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover // Plant. Physiol. 1987. V. 85. P. 335–342.

Occurrence of the Ability to Suppress the Growth of Related Strains in Rhizobia

Al. Kh. Baymiev¹*, A. A. Vladimirova¹, R. T. Matniyazov¹, A. M. Lavina¹,
K. Yu. Filyaeva¹, E. S. Akimova¹, and An. Kh. Baymiev¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: baymiev@mail.ru

Received June 19, 2023; revised July 6, 2023; accepted July 7, 2023

Abstract—Screening of 1019 strains of rhizobia *Rhizobium leguminosarum* and *Neorhizobium galegae* from the “Symbiont” collection of symbiotic rhizospheric microorganisms of the Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, which have been isolated from root nodules of 20 leguminous species, for the ability to suppress the growth of related strains of rhizobia was carried out. Inhibition of the growth of competing bacteria by rhizobia was shown to be rather common. On average, when grown on rich media, ~10% of rhizobial strains released antibacterial substances into the medium. At the same time, when a live culture of rhizobia was applied to the lawn of bacteria, the percentage of suppression was higher. The percentage of strains synthesizing antibacterial substances correlated also, to some extent, with the level of genetic diversity of the population of legume microsymbionts. A weak signal of impaired protein synthesis was found in the study of the mechanism of action of metabolites of 20 strains of rhizobia *R. leguminosarum* bv. *viciae* from root nodules of *Lathyrus palustris* and *Lathyrus vernus*. In other cases, the nature of the antibacterial action of bacterial metabolites could not be determined using the DualRep2 system.

Keywords: rhizobia, bacterial growth suppression, antibacterial mechanism